

粘虫蛹脑促前胸腺激素样活性物质对前胸腺 合成和分泌的影响

欧阳迎春, 唐 爽, 关雪辰

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

中图分类号: Q 965

文献标识码: A

促前胸腺激素 (Prothoracicotrophic hormone, PTTH) 是由脑神经内分泌细胞产生的, 调节前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素。PTTH 是在昆虫中发现的第一个激素, 也是在动物中发现的第一个神经激素^[1]。到目前为止, 研究人员已分离纯化了烟草角蛾 *Manduca sexta* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 PTTH^[2], 并弄清了家蚕 PTTH 的基因和氨基酸序列^[3]。我国关于 PTTH 的研究主要集中在少数几种昆虫上^[4,5]。本文应用蜕皮甾类激素放射免疫测定方法和前胸腺离体培养技术, 以我国重要的农业害虫粘虫 *Mythimna separata* 为研究对象, 研究 PTTH 作用和前胸腺分泌活动的特点, 为 PTTH 的研究积累更多的数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

粘虫幼虫以人工饲料^[6]饲养, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期为 16 h 光照, 8 h 黑暗。

1.2 PTTH 样活性物质的提取

定量摘取化蛹后 0~3 h 的蛹脑, 立即放入盛有冰重蒸水的微量匀浆器中, 冰水浴匀浆 10 min, 匀浆物沸水浴加热 2 min, 立即冷却, 以 10 000 r/min 的转速, 离心 5 min, 取上清液, 沉淀重复抽提一次, 合并两次上清液, 冷冻干燥后, -20°C 保存, 使用时用 Grace 液 (Gibco 公司生产) 稀释。

1.3 前胸腺的体外培养

前胸腺在解剖镜下, 成对摘取自末龄幼虫。将一侧前胸腺放入 50 μL 含蛹脑提取物的 Grace 液 (pH 为 6.6) 中, 另一侧放入等体积的不含蛹脑提取物的 Grace 液中作为对照, 25°C , 黑暗, 高湿, 悬浮培养。培养一定时间后吸取部分培养液, 进行蜕皮甾类激素的放射免疫测定。

1.4 蜕皮甾类激素的放射免疫测定

蜕皮甾类激素的放射免疫测定参考曹梅讯等^[7]建立的方法。蜕皮激素放射免疫测定药盒由中国科学院上海昆虫所曹梅讯提供。由于标准品为 20-羟基蜕皮酮, 所以蜕皮激素含量以 20-羟基蜕皮酮当量折算。

2 结果

2.1 前胸腺合成分泌蜕皮甾类激素的时相进程

一组末龄 4 天幼虫的前胸腺, 一侧在含有 1 个蛹脑当量蛹脑提取物的培养液中, 另一侧培养液中不含蛹

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39630050)

收稿日期: 1999-07-19, 修订日期: 2000-01-26

脑提取物, 分别培养 2, 4, 6, 8 h 后收集培养液, 进行蜕皮甾类激素的放射免疫测定。从图 1 可以看出, 前胸腺在不加蛹脑提取物的培养液中, 蜕皮甾类激素的合成和分泌在 8 h 的培养中保持较低的水平。而在培养液中加入蛹脑提取物后, 前胸腺被活化, 培养 4 h 前胸腺的合成和分泌达到高峰, 培养 6 h 虽有增加但不显著, 再延长培养时间, 前胸腺的合成和分泌趋于稳定。因此前胸腺的体外培养选择 6 h 为宜。

2.2 不同发育期的末龄幼虫和化蛹当天的前胸腺的合成和分泌机能

分别将末龄幼虫 1, 2, 3, 4, 5, 6 天和化蛹当天的一侧前胸腺放入 50 μ L 含 1 个蛹脑当量的蛹脑提取物的培养液中, 另一侧放入不含蛹脑提取物的培养液中, 培养 6 h, 测定培养液中蜕皮甾类激素, 其中活化比为处理组与对照组的比值, 见图 2。

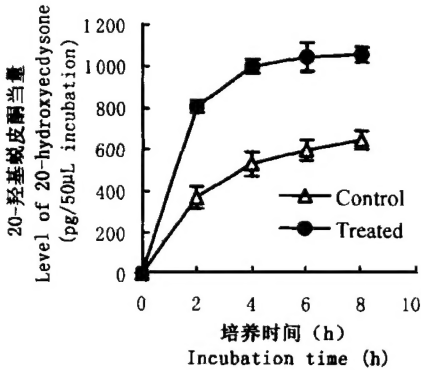


图 1 前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素的时相进程

Fig.1 Time course of ecdysteroid synthesis by prothoracic glands of *M. separata*

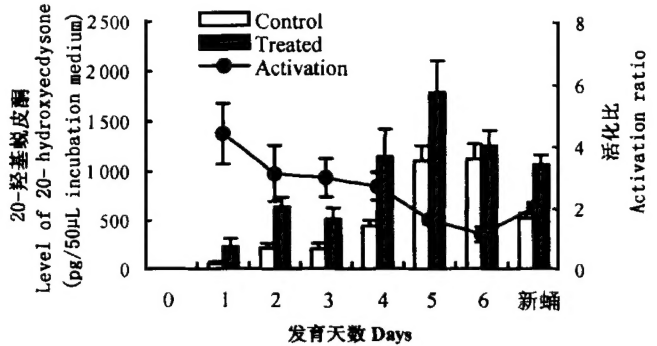


图 2 蛹脑提取物对末龄幼虫和新化蛹的前胸腺活性的影响

Fig.2 Effect of pupal brain extracts on the activity of prothoracic glands from instar larvae and newly formed pupae

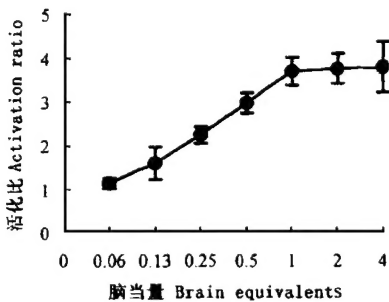


图 3 末龄 2 天的前胸腺对蛹脑提取物的剂量反应

Fig.3 Dose responses of prothoracic glands of day-2 last instar larvae to pupal brain extracts

前胸腺在不加蛹脑提取物的培养液中培养, 有不同程度的自发分泌蜕皮甾类激素的能力, 以末龄第 1 天最低, 第 6 天最高, 化蛹当天的前胸腺的合成和分泌有所降低, 即在化蛹前, 前胸腺的合成和分泌有一高峰。而在培养液中加入蛹脑提取物后, 前胸腺的合成和分泌明显增加, 活化比以第 1 天最高, 第 6 天最低, 即发育早期的前胸腺对蛹脑提取物的反应较发育后期的前胸腺敏感。

2.3 前胸腺对蛹脑 PTTH 样活性物质的剂量反应

末龄幼虫 2 天的前胸腺, 一侧分别在含有 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 和 0.06 蛹脑当量的蛹脑提取物的培养液中, 另一侧的培养液不含蛹脑提取物, 培养 6 h 后测定培养液中的蜕皮甾类激素。结果以活化

比为纵坐标对蛹脑提取物的剂量的对数做图, 呈典型的 Logistic 曲线。

从图 3 可以看出, 用 0.06 蛹脑当量即可以使前胸腺活化, 活化比为 1.15, 用 1.0 蛹脑当量, 可以显著地促进前胸腺的合成和分泌, 活化比为 3.71。培养液中再增加蛹脑提取物的量, 前胸腺合成分泌蜕皮激素能力增加不明显, 即蛹脑提取物中 PTTH 样的活性物质对前胸腺的活化达到了饱和, 饱和和激活剂量为 1.0 蛹脑当量。

3 讨论

本文用放射免疫测定方法和前胸腺离体培养技术, 对粘虫蛹脑提取物的作用和幼虫前胸腺的分泌活动进行了研究。从实验中可以看出, 粘虫蛹脑(化蛹 0~3 h 内)提取物中存在能促进前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素的 PTTH 样活性物质, 在离体条件下, 前胸腺在一定量 PTTH 样活性物质的作用下, 能很快合成和分泌蜕皮甾类激素。这一点已在许多鳞翅目昆虫和一些双翅目昆虫中得到证实^[8]。在昆虫生长发育的不同时期, 前胸腺具有不同的合成和分泌机能, 对 PTTH 反应的敏感度也不一样, 当前胸腺基础分泌率较低时, PTTH 对它的促进较明显。这些变化表明, 蜕皮激素的合成和分泌是受到调控的^[9]。粘虫蛹脑 PTTH 样活性物质对前胸腺的剂量反应与其它昆虫的 PTTH 对前胸腺的剂量反应一致^[4,5]。

过去一般认为蜕皮激素的生物合成只受 PTTH 的正刺激, 但近年来的研究表明, 脑也分泌一种抑制蜕皮激素生物合成的神经肽。有研究者从一种丽蝇 *Calliphora vicina* 脑中纯化出具有抑制前胸腺合成和分泌蜕皮激素的肽类激素——前胸腺抑制激素(Prothoracicostatic hormone, PTSH)^[10]。那么在粘虫蛹脑中是否也存在 PTSH 呢? 如果存在, 可能是因为蛹脑粗提物中的 PTTH 和 PTSH 协同作用于前胸腺, PTTH 的作用远大于 PTSH 的作用, 因而在生物测定过程中只看到促前胸腺的作用。这仅是一种推测, 许多问题有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Bollenbacher W E, Granger N A. Endocrinology of the prothoracicotrophic hormone. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. New York: Pergamon. 1985, 7: 109~151
- [2] Nijhout H F. Insect Hormones. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 1994
- [3] Kawakami A, Iwami M, Nagasawa H *et al.* Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotrophic hormone. Science, 1990, 247: 1 333~1 335
- [4] 华跃进, 曹梅讯, 吴载德. 桑蚕促前胸腺激素的作用与前胸腺分泌活动的某些特点. 昆虫学报, 1988, 31 (2): 123~128
- [5] 郭素堂, 刘瑞林, 蒋容静等. 亚洲玉米螟末龄幼虫促前胸腺激素与蜕皮甾类激素滴度的变化. 昆虫学报, 1992, 35 (1): 15~21
- [6] 毕富春. 粘虫的简易人工饲料及防腐剂对生长发育的影响. 昆虫知识, 1983, 20 (6): 260~263
- [7] 曹梅讯. 20-羟基蜕皮酮的放射免疫分析及在蓖麻蚕上的应用. 昆虫学研究集刊, 1980, 第一集, 1~6
- [8] Koolman J. Control of ecdysone biosynthesis in insects. Neth. J. Zool., 1995, 45: 83~88
- [9] Smith S L. Regulation of ecdysteroid titer: Synthesis. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. New York: Pergamon. 1985, 7: 295~341
- [10] Hua Y J, Jiang R J, Koolman J. Multiple control of ecdysone biosynthesis in blowfly larvae: Interaction of ecdysiotropins and ecdysioistatins. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1997, 35: 125~134

Effect of prothoracicotrophic hormone-like material from pupal brains on synthesis and secretion of prothoracic gland in *Mythimna separata*

OUYANG Ying-chun, TANG shuang, GUAN Xue-chen

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)